一个调控抗菌肽表达的小菜蛾肽聚糖识别蛋白(PxPGRP-SA)

郑志华，许小霞，余 静，高延富，张玉清，欧阳莉娜，金丰良*

(华南农业大学农学院，广东省生物农药创制与应用重点实验室，广州 510642)

摘要:【目的】肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)是昆虫免疫系统中一类重要的模式识别蛋白。本研究旨在阐明经苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 侵染后，小菜蛾 *Plutella xylostella* PGRP-SA 基因(命名为 *PxPGRP-SA*)在体内的表达模式和对抗菌肽基因的表达调控。【方法】本研究利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术分析 *B. thuringiensis* 侵染小菜蛾幼虫后 *PxPGRP-SA* 的转录模式，通过 RNAi 技术结合抗血清封闭实验检测 *PxPGRP-SA* 对小菜蛾抗菌肽基因的表达调控作用。【结果】qRT-PCR 检测表明，小菜蛾 4 龄幼虫在注射具有活性的 *B. thuringiensis* 6 h 后，*PxPGRP-SA* 在脂肪体和血细胞中表达量迅速上升，其中脂肪体中的表达量在注射 24 h 后达到高峰，而在血细胞中的表达量在 18 h 后达到高峰。RNAi 沉默小菜蛾 4 龄幼虫 *PxPGRP-SA* 的转录后，可显著降低小菜蛾脂肪体中 *cecropin*, *moricin*-2, *lysozyme* 和 *defensin* 4 个抗菌肽基因 及 *Dorsal* 和 *Spätzle* 基因的 mRNA 转录水平；注射 anti-PxPGRP-SA 封闭小菜蛾体内 PxPGRP-SA 的活性后，也可降低小菜蛾脂肪体中 4 个抗菌肽基因的 mRNA 转录水平；*PxPGRP-SA* 转录沉默后，同时导致添食 *B. thuringiensis* 的小菜蛾幼虫的存活率明显降低。【结论】PxPGRP-SA 参与了小菜蛾体内抗菌肽 *cecropin*, *moricin*-2, *lysozyme* 和 *defensin* 基因的表达调控，并在免疫防御 *B. thuringiensis* 的侵染过程中起了重要的作用。

关键词: 小菜蛾；肽聚糖识别蛋白；RNAi；抗血清；抗菌肽表达

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)05-489-11

A peptidoglycan recognition protein (PxPGRP-SA) regulating the expression of antimicrobial peptides in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

ZHENG Zhi-Hua, XU Xiao-Xia, YU Jing, GAO Yan-Fu, ZHANG Yu-Qing, OUYANG Li-Na, JIN Feng-Liang* (Key Laboratory of Bio-Pesticide Innovation and Application of Guangdong Province, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Aim】Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) are one kind of important pattern recognition proteins in insect immune system. In this study, we aim to investigate the expression patterns of *PGRP-SA* from *Plutella xylostella* (designated as *PxPGRP-SA*) and its involvement in the regulation of the expression of antimicrobial peptide genes in *P. xylostella* after infection by *Bacillus thuringiensis*. 【Methods】The transcription pattern of *PxPGRP-SA* in *P. xylostella* larvae infected by *B. thuringiensis* was analyzed by quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR), and the regulation of the expression of antimicrobial peptide genes by *PxPGRP-SA* in *P. xylostella* was investigated by RNAi technology and antiserum blocking assay.【Results】qRT-PCR analysis revealed that the transcripts of

基金项目：国家自然科学基金项目(31071734, 30900943)；广州市科技计划项目(201509010023)

作者简介：郑志华，女，1989 年 12 月生，山西朔州人，硕士研究生，研究方向为昆虫先天性免疫及信号通路，E-mail: 912024976@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jflbang@163.com

收稿日期 Received: 2015-11-10；接受日期 Accepted: 2016-03-24

PxPGRP-SA increased significantly at 6 h after injection of live *B. thuringiensis* into the fat body and hemocytes of the 4th instar larvae of *P. xylostella*, with the highest expression level at 24 h in fat body and 18 h in hemocytes, respectively. The transcript of *PxPGRP-SA* in the 4th instar larvae of *P. xylostella* decreased due to RNAi. Blocking down the transcript of *PxPGRP-SA* by RNAi also reduced the transcriptional levels of four antibacterial peptide genes including *cecropin*, *moricin*-2, *lysozyme* and *defensin* in the 4th instar larvae and the mRNA levels of Dorsal and Spätzle genes significantly. Blocking the activity of PxPGRP-SA by injection of anti-PxPGRP-SA serum into the 4th instar larvae of *P. xylostella* also decreased the transcription levels of antibacterial peptide genes in the fat body rapidly. Silence of the expression of *PxPGRP-SA* decreased the survival rate of *P. xylostella* larvae feeding live *B. thuringiensis* significantly. 【Conclusion】PxPGRP-SA is involved in regulating the expression of downstream antibacterial peptide genes including *cecropin*, *moricin*-2, *lysozyme* and *defensin* in *P. xylostella*, and plays an important role in the immune defense of *P. xylostella* against *B. thuringiensis* infection.

Key words: *Plutella xylostella*; peptidoglycan recognition protein; RNAi; antiserum; antimicrobial peptides

昆虫和其他节肢类动物一样,没有获得性免疫系统,依赖于其先天性免疫(体液免疫和细胞免疫)来抵御有害微生物的入侵(Lemaitre and Hoffmann, 2007);该过程主要包括体液免疫中IMD和Toll信号途径调控表达的抗菌肽和酚氧化酶(phenoloxidase, PO)级联反应(Cerenius *et al*., 2008),以及细胞免疫中的吞噬作用(Beck and Strand, 2005)。昆虫激活这些信号通路主要依赖于体内模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别入侵病原微生物体壁上的保守病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),包括细菌中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、肽聚糖(peptidoglycan, PGN)和真菌中的葡聚糖(β-1,3-glucan)(Huang *et al*., 2015)。

PGN是许多细菌细胞壁的主要成分,由N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸交替连接的杂多糖与不同组成的肽交叉连接形成的大分子。肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)是先天性免疫系统中,可以免疫识别外来的PGN,并启动信号传导的关键PRR。PGRP作为模式识别受体,首次从家蚕 *Bombyx mori* 血淋巴中纯化获得,能够识别结合细菌肽聚糖激活酚氧化酶级联反应。它的mRNA可以在脂肪体、血细胞和表皮细胞表达,而且,在脂肪体中可以被细菌正向诱导表达(Ochiai and Ashida, 1999)。陆续地,从其他昆虫如墨腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、粉纹夜蛾 *Trichoplusai ni* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*,以及哺乳动物包括小鼠和人类中发现很多的PGRP基因(Kang *et al*., 1998; Dziarski, 2004; Steiner, 2004; Dziarski and Gupta, 2006; Ni *et al*., 2007; Li *et al*., 2015)。

昆虫中的PGRPs具有识别、信号放大和效应器的功能,所有这些功能对于先天免疫都很重要(Xia *et al*., 2015)。果蝇中有13个PGRP基因,转录表达至少17个PGRP蛋白(Werner *et al*., 2000; Yu *et al*., 2014)。果蝇PGRPs根据其氨基酸的多少,分为短型PGRPs(PGRP-SA, PGRP-SB1, PGRP-SB2, PGRP-SC1a, PGRP-SC1b, PGRP-SC2和PGRP-SD)和长型PGRPs(PGRP-LAa, PGRP-Lab, PGRP-LCx, PGRP-LCy, PGRP-LD, PGRP-LF, PGRP-LAc, PGRP-LB和PGRP-LE)(Werner *et al*., 2000; Kurata, 2004)。7个短型PGRP-S蛋白都有1个信号肽,缺乏跨膜域,可能会分泌胞外(Kurata, 2014)。在果蝇中,2个短型PGRP家庭成员(PGRP-SA和PGRP-SD)和革兰氏阴性细菌结合蛋白1(GNBP1)在Toll通路上游形成一个循环的PRR复合体。PGRP-SA通过结合革兰氏阳性细菌的细胞壁上肽聚糖触发蛋白酶级联反应,活化Spätzle配体,诱导了Toll受体的二聚化,并传送信号到核转录因子(NF-κB),最终启动了抗菌肽的表达。果蝇PGRP-LC启动imd途径,诱导抗菌肽的表达(Gottar *et al*., 2002; Royet, 2004; Kaneko *et al*., 2006; Gendrin *et al*., 2013; Kurata, 2014)。在果蝇中,革兰氏阳性细菌侵染主要激活Toll信号传导通路,在脂肪体细胞中诱导产生抗菌肽并快速分泌到循环的血淋巴中,杀死侵染的细菌(Kurata, 2014; Valanne, 2014)。

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 作为生物合理性用药的杀虫剂代表,是一种在自然界中普遍存在的能产生芽胞的革兰氏阳性菌,并在其生长的平稳期能形成晶体毒素,抑制害虫的生长。目前研究者对晶体毒素杀虫机理都比较关注(Elleuch

et al., 2015; Guo *et al.*, 2015)，但对 *B. thuringiensis* 与宿主的系统免疫研究不多。阐明 *B. thuringiensis* 与宿主的免疫互作机制，将有助于更好地利用 *B. thuringiensis* 作为生物杀虫剂防治害虫。本研究根据实验室已经获得小菜蛾的短型 *PGRP-SA* (GenBank 登录号: EU399240)全长 cDNA 序列，利用 qRT-PCR 分析 *PGRP-SA* 对 *B. thuringiensis* 侵染后的表达模式；通过 RNAi 技术结合抗血清封闭实验检测了 PGRP-SA 对抗菌肽的表达调控及 *PGRP-SA* 沉默后的小菜蛾对 *B. thuringiensis* 的敏感性。本研究结果为进一步研究利用 *B. thuringiensis* 防治小菜蛾提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 华南农业大学教育部生物教育部工程研究中心保存，光周期 14L∶10D，温度 27±1℃，相对湿度 60%～70%。

1.2　质粒与菌株

克隆载体 pMD18-T，购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司，大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α、BL21 和原核表达载体 pET32a 由本实验室保存。玫烟色棒束孢 *Paecilomyces fumosoroseus*，绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*，金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 由本实验室保存，苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* (Bt)菌株(HD73)由中国农业科学院植物保护研究所张杰研究员馈赠。

1.3　主要试剂药品

限制性内切酶 B*am*H Ⅰ 和 H*ind* Ⅲ 购自 New England Biolab (NEB) 公司；双链 RNA 的合成试剂盒 T7 RiboMAX™ Express RNAi Sytem 购自 Promega 公司；二抗羊抗兔-IgG-AP 和显色试剂盒 NBT(nitro blue tetrazolium)和 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)购自武汉博士德生物工程有限生物公司；PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司；定量反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix 购自 TaKaRa 公司；质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司，Ni-NTA 亲和纯化柱购自 Qiagen 公司；Ex Taq 和 dNTP Mixture 购自 TaKaRa 公司；DEPC, IPTG 和 EB Free 均购自 Sigma 公司，其他试剂均为国产分析纯。

1.4　不同微生物对 PxPGRP-SA 表达的影响

分别将苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 和大肠杆菌 *E. coli* DH5α 接种至新鲜的 LB 培养基，玫烟色棒束孢 *P. fumosoroseus* 和绿僵菌 *M. anisopliae* 接种到新鲜的 YEPD 培养基，37℃ 240 r/min 摇荡培养至对数生长期，10 000 g 离心 10 min，去掉上清收集菌体，PBS 洗两次，热灭活后用 PBS 稀释至 2.0×10^7 CFU/mL 备用。

选取同一批次龄期一致、发育良好的 4 龄第 1 天的小菜蛾幼虫作为实验材料，分别注射苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus*、大肠杆菌 *E. coli* DH5α、玫烟色棒束孢 *P. fumosoroseus* 和绿僵菌 *M. anisopliae*，每头注射 1 μL (2.0×10^7 CFU/mL)，每组处理 6 头虫，1 μL PBS 作为注射对照。24 h 收集虫体，根据 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA (Invitrogen, 美国)。根据 PrimeScript™ RT Master Mix 说明书的操作进行 cDNA 的合成(Perfect Real Time) (TaKaRa, 日本)。根据 *PGRP-SA* 的 cDNA 序列(GenBank 登录号: EU399240)设计了 *PGPR-SA* 的特异性引物，qRT-PCR 引物如表 1，定量体系总体积是 16.5 μL 包括上下游引物各 1 μL, 12.5 μL SYBR® Green PCR Master Mix 和 2 μL 稀释模板 cDNA。程序按以下步骤进行：94℃ 预变性 30 s；94℃ 变性 15 s，60℃退火 20 s，然后 72℃ 延伸 30 s，读板检测，循环 40 次。而内参基因为 *β-actin* (GenBank 登录号: AB282645)也用同样的 cDNA 模板进行扩增。根据溶解曲线分析用来判断扩增产物是否相对专一。*PGRP-SA* 基因的相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 为实验组/对照组的比值，其中 ΔΔCt = (Ct 目的 − Ct 内参)实验 − (Ct 目的 − Ct 内参)对照。由于每组中目的基因和内参基因加入的模板量是一致的，所以可以对每个样本 ΔCt = (Ct 目的 − Ct 内参)值采用 SPSS19 软件进行组间比较后再进行 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。每个模板 cDNA 样品设置 3 次重复，每个实验进行 3 次生物学重复。

1.5　苏云金芽胞杆菌刺激后不同组织 *PxPGRP-SA* 的表达模式

将苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 接种至新鲜的 LB 培养基，37℃ 240 r/min 摇荡培养至对数生长期，收集 10 min 菌液，10 000 g 离心，去掉上清收集菌体，PBS 洗两次，PBS 稀释至 2.0×10^7 CFU/mL 备用。选取同一批次龄期一致、发育良好的 4 龄第 1 天的小菜蛾幼虫作为实验材料，每头幼虫注射苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 1 μL(2.0×10^7 CFU/mL)，处理 80 头虫。并于注射后 6, 12, 18, 24, 30, 36 和 42 h 收集虫体，每次收集 6 头幼虫。并分

别在冰上解剖,取其脂肪体、血细胞、中肠和表皮。总 RNA 的提取,cDNA 的合成,定量程序的设计和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$计算参照前面的方法。每个样品设置 3 次重复实验。每个实验进行 3 次生物学重复。

1.6 小菜蛾 PGRP 基因的原核表达

根据小菜蛾 *PGRP-SA* 基因的 ORF(open reading frame)序列设计一对特异性引物,引物序列如表 1,为了便于将 PCR 产物亚克隆到表达载体 pET-32a(+)上,在上游引物设计了 *Bam*HⅠ酶切位点,下游引物中有 *Hin*dⅢ酶切位点。PCR 产物用 *Bam*HⅠ和 *Hin*dⅢ双酶切,经割胶回收纯化,与经同样酶切的表达质粒 pET-32a(+)(Novagen)连接,构建表达质粒 pET-*PxPGRP-SA* 并转化入 BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞中,酶切和测序鉴定。将酶切和测序鉴定正确的单克隆于 10 mL LB 培养基中(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)过夜培养,次日以 1∶100 稀释继续 37℃培养,当 A_{600} = 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)诱导目的蛋白的表达。28℃培养 6 h 后,培养物经高速离心并用裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 0.5% TritonX-100, 2 mg/mL 溶菌酶)裂解细胞沉淀,经超声及高速离心后,上清液经过 Ni^{2+}-NTA 柱(Qiagen,美国)分离和纯化融合蛋白,经透析、冷冻干燥并最终溶解于 PBS (pH 7.4)使其终浓度为 1 mg/mL,置于 -70℃保存。

1.7 多克隆抗体的制备及其纯化

参照 Green 和 Sambrook(2012)的方法进行,免疫接种前先取耳静脉血样作为阴性对照。以纯化融合蛋白 Trx-PxPGRP-SA 作为抗原,取抗原约 400 μg,与等体积的弗氏完全佐剂混合均匀,完全乳化后,于兔背部分 20~30 个点皮下注射。注射 14 d 后,取抗原约 400 μg,与等体积的弗氏不完全佐剂混合均匀,完全乳化后,注射加强针。总共加强 3 次,每次间隔两周。在每次注射加强针后,耳静脉取血 3 mL 检测抗体水平。第 3 次注射加强针后 10 d 内颈动脉取血。将新鲜采集的血液置 37℃中作用 30 min 至 1 h,使血液凝固,将血凝块与容器周边划开,然后转移至 4℃中过夜。使血凝块收缩,在 4℃下用 10 000 g 离心 10 min,取其上清。将抗体分装后置于 -80℃保存备用。

利用正辛酸-硫酸铵分部沉淀法纯化抗体。取一份抗血清加入 4 份 60 mmol/L(pH 4.0)的醋酸 Buffer,用 NaOH 调节 pH 为 4.5。以每毫升稀释液中加入 25 μL 正辛酸的比例,搅拌 30 min。4℃ 10 000 g 离心。弃沉淀,取上清液通过定性滤纸过滤,加入 5 倍体积的 1×PBS,调节 pH 为 7.4,然后在冰浴下按每毫升混合液加 0.27 g 硫酸铵,继续搅拌 30 min。4℃ 9 000 g 离心 15 min,收集沉淀,溶解于 1×PBS 中,透析至无 NH_4^+,冷冻干燥, -80℃保存。

1.8 多克隆抗体的封闭

选取同一批次发育良好的 4 龄第 1 天小菜蛾幼虫,放置冰上冷冻 30 s,将纯化后的多克隆抗血清 anti-PxPGRP-SA(1 μg/μL)1 μL 注射到 4 龄第 1 天的小菜蛾体内(1 μg/头,30 头),注射完后迅速用液体石蜡封闭伤口。同时分别注射 1 μL 1×PBS Buffer(1 μL/头,30 头)和 1 μL 兔原血清(1 μg/头,30 头)作为对照, 30 min 后再次分别注射 1 μL *B. thuringiensis* (2.0×10^7 CFU/mL)小菜蛾体内 24 h,注射后正常饲养,实验重复 3 次。抽提总 RNA,并反转录成 cDNA,利用 qRT-PCR 检测小菜蛾体内免疫相关基因(*cecropin*, *moricin*-2, *gloverin*, *defensin*, *lysozyme*, *Spätzle* 和 *Dorsal*)mRNA 的转录水平。qRT-PCR 的方法如上,每种处理设计 3 次生物学重复。

1.9 RNAi

采用 T7 RiboMAX™ Express RNAi Sytem (Promega,美国),体外转录合成小菜蛾 *PxPGRP-SA* 基因以及对照基因 GFP 的 dsRNA,通过显微注射的方法注入小菜蛾体内。根 T7RiboMAX™ Express RNAi System 说明书设计引物扩增 dsRNA 体外转录所需的 *PxPGRP-SA* 及 GFP 基因模板片段,引物序列 5′端加 T7 启动子序列,具体引物序列见表 1。PCR 反应体系同上,反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,30 个循环;72℃延伸 10 min 后,检测,产物回收,送样测序,于 -20℃或 -70℃保存。

大量饲养小菜蛾,挑选发育一致、健康的 4 龄幼虫,使用微量注射器将 dsRNA 缓慢注入小菜蛾体内,注射实验分为 4 个组,注射 1 μL *PxRGRP-SA* (1 μg/μL) dsRNA 组、注射 1 μL GFP(1 μg/μL)基因 dsRNA 组、注射 1 μL PBS 缓冲液组和 CK 组(未做任何处理),每组注射 20 头幼虫,注射后正常饲养;将 RNAi 24 h 的小菜蛾进一步注射苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis* 24 h 后,取其脂肪体,利用 qRT-PCR 对 *PxPGRP-SA*、下游抗菌肽基因(*gloverin*, *defensin*, *cecropin*, *moricin*-2 和 *lysozyme*)及相关基因(*Dorsal* 和 *Spätzle*)的 mRNA 转录水平进行检测。qRT-PCR 的方法如上,每个样品进行 3 次生物学重复。

采用叶片浸渍饲喂法（Tabashnik *et al*., 1994；杨峰山等，2006）检测苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 对小菜蛾致死率的效果。先将 *B. thuringiensis* 配制成浓度为 2.0×10^7 CFU/mL，以清水为对照。取新鲜甘蓝苗嫩叶片，用打孔器打下直径 6 ㎝的圆片，分别在 *B. thuringiensis* 溶液中浸渍约 10 s，取出自然晾干后，放入 12 cm 直径的培养皿中（垫有滤纸保湿），并接入供试小菜蛾幼虫。设 3 次重复，每个重复实验选取 80 头。饲养条件：温度 27±1℃，光周期 14L∶10D，相对湿度 60%～70%。每隔 6 h 统计死亡率，一直取样到饲喂 48 h。

1.10　Western blot 分析

参照 Green 和 Sambrook（2012）等的方法稍作修改进行 Western blot 杂交。具体操作如下：首先用封闭液（TBST+5% 的脱脂奶粉）封闭 2 h，接着与一抗 anti-PGRP-SA（用 TBST 按 1∶2 000 的比例稀释）室温反应 1 h，用 PBST（50 mmol/L 磷酸钾，pH 7.2；150 m mol/L NaCl；0.05% Tween 20）洗膜 3 次，然后加入 PBST 稀释的羊抗兔-IgG-AP（1∶3 000，v/v），室温反应 1 h，用 PBST 洗膜 3 次，最后将 PVDF 膜置于含有 NBT（nitro blue tetrazolium）和 BCIP（5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate）的显色液中显色至条带清晰，将膜放入蒸馏水中漂洗终止显色反应。取出晾干，拍照。

1.11　数据统计与分析

实验数据的分析、处理与绘图采用 SPSS19 和 Excel 2013；计算平均值和标准误（*SE*），采用一维方差分析（One-way ANOVA）中的最小显著差法（LSD）分析，多重比较采用 Duncan 氏新复极差检验法，差异显著性水平为 $P<0.05$。

表 1　实验所用的引物

Table 1　Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences	目的产物 Target product
PGRP-Exp-F	GCG*GGATCC*ATGACGTTGTCTTTTGGCGTGTTTC	肽聚糖识别蛋白 PGRP-SA
PGPR-Exp-R	GGC*AAGCTT*CTTGTTGTTTTAATCTTATCAAT	
PxLys-qf	CGCATTGTCTGAAGGGAAGGT	溶菌酶 Lysozyme
PxLys-qr	TTGATCTGGAACAGCCCGTAG	
Px Def-qf	AGGACTGAGGAGGTCAAAGCT	防御素 Defensin
Px Def-qr	CGTCTTCGTACTGGCAAGGTA	
Px Mor-qf	GTCAACGTCAACGCCCTCAAG	家蚕抗菌肽 Moricin-2
Px Mor-qr	GTCCACCCCTGGCACTGTCTA	
Px Cep1-qf	GCCAAGGTGGAAGCCGTTTA	天蚕素 Cecropin
Px Cep1-qR	TATAGAAGTGGCTTGTCCGATGA	
Px Glo-qf	GGGGATTCAACCACGAGCAGTCACAGC	葛老素 Gloverin
Px Glo-qr	TGTGCCGTGGCTCAAGTTTC	
PxSpa-qf	CAATCCAAAACACTCCCGAC	配基 Spätzle
PxSpa-qr	ATTAGCTATGCTTTCCAACC	
PxDor-qf	TTCACCACGCCGCCTTAC	转录因子 Dorsal
PxDor-qr	CGGTTTCTGTCGCTTTCG	
PxPGRP-qf	TGTGGCGTGGTGACCAGACAGCAGT	肽聚糖识别蛋白 PGRP-SA
PxPGRP-qr	TGCGTATGAGTGAGACAGGTGTCC	
β-actin-qN	GTTGCCCCGAAGCCCTGTT	肌动蛋白 β-actin
β-actin-qC	GCGCGGTGATCTCCTTCTGC	
T7GFP-qf	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG	绿色荧光蛋白 GFP
T7GFP-qr	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAGCAGGACCATGTGATCGCGC	
T7PxPGRP RNAi-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGACCGAACTTCCTGATTG	肽聚糖识别蛋白 PGRP
T7PxPGRP RNAi-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAATATCCTCGAGGTAGTTTGGCC	

PGRP-SA 中引物中下划线示酶切位点；*PGRP* 和 *GFP* 引物中下划线示 T7 启动子序列。Underline in PGRP-SA primers indicates the cleavage site of restriction enzyme, while underline in PGRP and GFP primers indicates T7 promoter sequence.

2　结果

2.1　不同微生物对 *PxPGRP-SA* 的诱导结果

qRT-PCR 检测显示，注射大肠杆菌 *E. coli* DH5α、金黄色葡萄球菌 *S. aureus*、苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*、玫烟色棒束孢 *P. fumosoroseus* 和绿僵菌 *M. anisopliae* 都能诱导小菜蛾 4 龄幼虫脂肪体中 *PxPGRP-SA* 在 24 h 内表达水平上调，其中，苏云金芽孢杆菌诱导能力更强一些，与对照相比，*PxPGRP-SA* 表达量上调 82 倍（图 1），达到差异显著水平（$P<0.05$），表明 *PxPGRP-SA* 基因的表达对苏云金芽孢杆菌的刺激最为敏感。

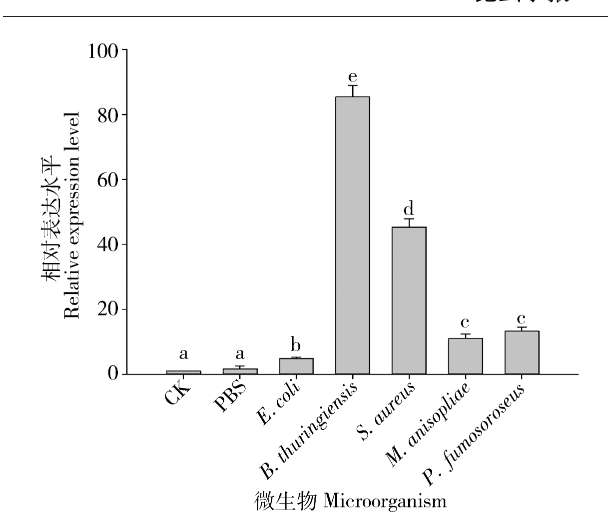


图 1 不同病原微生物刺激 24 h 后小菜蛾 4 龄幼虫脂肪体中 *PxPGRP-SA* 基因的表达量

Fig. 1 Expression level of *PxPGPR-SA* in fat body of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella* at 24 h after challenge with different pathogens

CK：没有做任何处理的健康虫体 Healthy larvae without any treatment；PBS：PPS 缓冲液 PBS buffer；*E. coli*：大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α；*B. thuringiensis*：苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*；*S. aureus*：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*；*P. fumosoroseus*：玫烟色棒束孢 *Paecilomyces fumosoroseus*；*M. anisopliae*：绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*. 利用 qRT-PCR 检测 *PxPGRP-SA* 在不同微生物诱导下 24 h 的转录水平，误差线代表 ± *SE*（*n* = 3），*β-actin* 作为内参基因，不同字母表示不同处理间差异显著水平（$P < 0.05$）（Duncan 氏新复极差检验法）。The mRNA level of *PxPGRP-SA* was analyzed by qRT-PCR after pathogen induction, and *β-actin* was used as an internal control. Each bar represents the mean ± *SE* (*n* = 3). Means with different letters are significantly different among different treatments ($P < 0.05$) (Duncan's multiple range test).

2.2 苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 对 *PxPGRP-SA* 基因的诱导表达模式

qRT-PCR 检测显示，注射苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 6 h 后都可以诱导 *PxPGRP-SA* 基因在小菜蛾的脂肪体、血细胞、中肠和表皮中表达（图 2）。*PxPGRP-SA* 基因在不同组织中达到表达高峰的时间不同。相比较而言，*PxPGRP-SA* 在脂肪体（24 h）和血细胞（18 h）中表达量显著高于在表皮和中肠（30 h）中的表达量，表明苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 在血腔中能够引起小菜蛾系统性免疫，免疫防御苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 侵染的主要器官为血细胞和脂肪体。

2.3 小菜蛾 PGRP 基因的原核表达

将在广州艾基生物技术有限公司测序正确的原核表达质粒 pETPxPGRP-SA 转化大肠杆菌宿主菌 DE3，37℃ 下经浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h，离心后收集菌体，加入裂解液后经超声破碎，10 000 g 离心收集上清。经 Ni^{2+}-NTA 柱（Qiagen，美国）一步纯化了融合蛋白，SDS-PAGE 电泳检测到约 45 kDa 条带处有与预期分子量同等大小的融合蛋白（图 3）。Western blot 检测表明经诱导高效表达的蛋白为含有 6 × His 标签的融合蛋白 PxPGRP-SA。用纯化的融合蛋白免疫新西兰大白兔制备抗血清，利用抗血清 anti-PxPGRP-SA 进行 Western blot 检测，结果表明制备的抗血清可以特异地与融合蛋白结合 PxPGRP-SA（图 3），效价滴定表明制备的抗血清滴定浓度为 1∶12 800。

2.4 多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA 的封闭

将纯化的多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA（1 μg/μL）注射到小菜蛾体内 30 min 后，注射 1 μL 苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*（2×10^7 CFU/mL）诱导脂肪体中免疫基因的表达，利用 qRT-PCR 检测抗体的封闭效果（图 4）。结果表明，注射抗体封闭后，苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 诱导 24 h 后，与对照相比（未注射、注射 PBS 和注射兔原前血清），Toll 信号传导途径中的 *Spätzle* 和 *Dorsal* 基因转录显著低于对照组，同时下游抗菌肽基因 *defensin*，*cecropin*，*moricin*-2 和 *lysozyme* 的表达量低于对照组，其中，*lysozyme* 和 *cecropin* 表达量与对照之间达到差异极显著水平（$P < 0.05$）。结果表明，多克隆抗体 anti-PxPGRP-SA 能够与小菜蛾体内的 PGRP-SA 蛋白结合，在遭受微生物侵染后，PGRP-SA 启动下游抗菌肽的表达能力大大降低。

2.5 *PxPGRP-SA* 基因 的 RNAi

qRT-PCR 检测表明，注射 ds*PxPGRP-SA* 1 μL (1 μg) 18 h 后，*PxPGRP-SA* 的转录开始下降，24 h 后几乎完全沉默了 *PxPGRP-SA* 的表达，并且可以持续到 42 h（图 5），图 5 结果表明 RNAi 抑制了 *PxPGRP-SA* 的表达，与对照相比，达到差异显著水平，相对转录水平下调 9 倍。qRT-PCR 检测表明，沉默 *PxPGRP-SA* 的表达后可以显著降低 Spätzle 和 Dorsal 基因的转录水平（图 6），同时显著降低了 4 个抗菌肽基因（*defensin*，*cecropin*，*moricin*-2 和 *lysozyme*）的转录，但是对抗菌肽 gloverin 的表达没有影响。利用 RNAi 沉默小菜蛾体内 *PxPGRP-SA* 表达后，当添食 *B. thuringiensis* 小菜蛾 4 龄幼虫，0 – 12 h 内与对照相比，存活率没有区别，在 18 h 之后，沉默 *PxPGRP-SA* 之后的小菜蛾，其存活率开始显著降低，一直持续到 48 h，全部死完（图 7）。结果表明，在小菜蛾体内 *PxPGRP-SA* 可以调控小菜蛾体内 *defensin*，*cecropin*，*moricin*-2 和 *lysozyme* 等抗菌肽基因的表达，防御病原微生物 *B. thuringiensis* 的侵染。

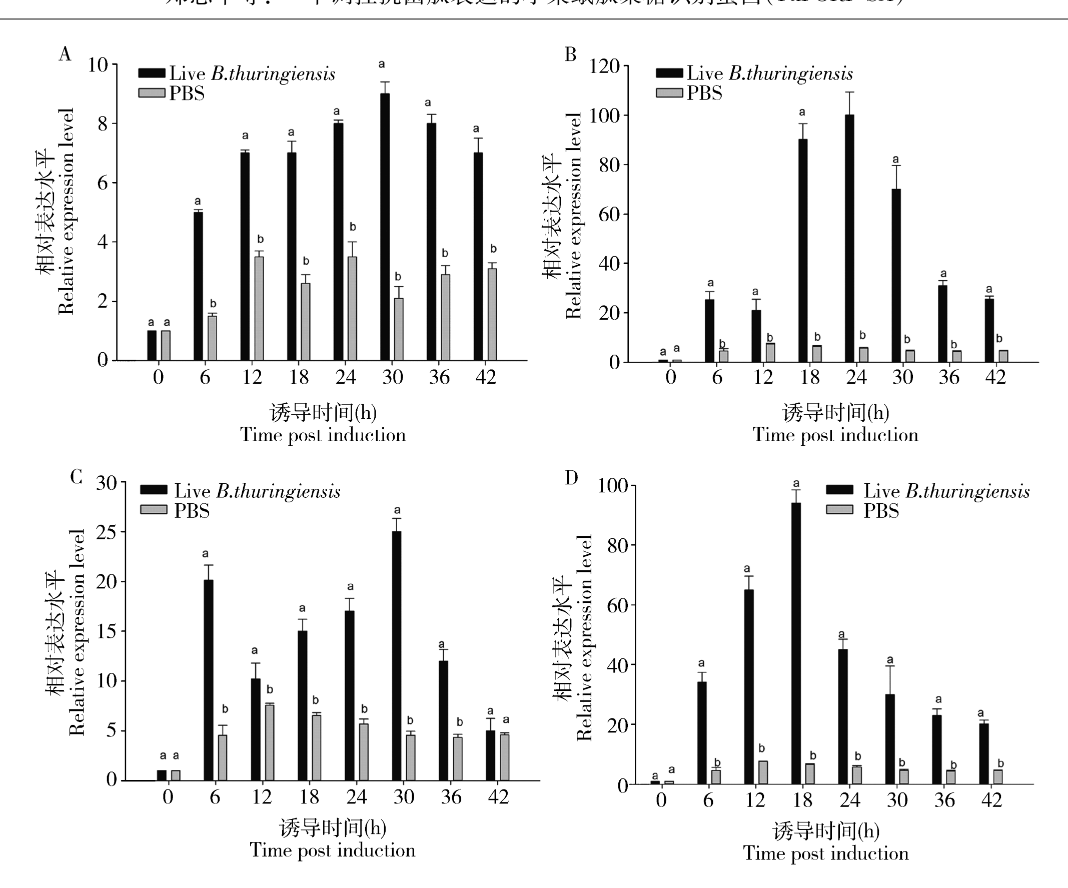


图 2　注射苏云金芽孢杆菌诱导小菜蛾 4 龄幼虫不同组织中 *PxPGRP-SA* 的表达量

Fig. 2　Expressional levels of *PxPGRP-SA* in different tissues of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella* after injection with live *Bacillus thuringiensis*

A：表皮 Epidermis；B：脂肪体 Fat body；C：中肠 Midgut；D：血细胞 Hemocyte. *B. thuringiensis* 注射诱导 4 龄幼虫后(2.0×10^7 CFU/头)，在 0，6，12，18，24 30，36 和 42 h 分别收集表皮、中肠、脂肪体和血细胞 4 个组织，利用 qRT-PCR 检测 *PxPGRP-SA* mRNA 的转录水平，误差线代表 ± *SE*($n=3$)，*β-actin* 作为内参基因，不同字母表示同一诱导时间不同处理间差异显著水平($P<0.05$)(Duncan 氏复极差检验)。The 4th instar larvae were injected with *B. thuringiensis* (2.0×10^7 CFU/larvae) and epidermis midgut, fat body and hemocyte were collected at different time points (0, 6, 12, 18, 24 30, 36 and 42 h, respectively). The mRNA level of *PxPGRP-SA* was analyzed by qRT-PCR, and *β-actin* was used as an internal control. Each bar represents the mean ± *SE* ($n=3$). Means with different letters are significantly different among different treatments of the same induction time ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test).

3　讨论

肽聚糖识别蛋白 PGRPs 蛋白家族在微生物感染的识别中起着至关重要的作用。PGRPs 家族成员从昆虫到哺乳动物高度保守，在 C 端有一个大约 165 个氨基酸组成的 PGRP 结构域，结构域在识别外源物时起着至关重要的作用，不同 PGRP 结构域可能是区分识别不同种类微生物的作用机制(Blanco *et al*., 2008)。到目前为止，已经在昆虫中发现了 19 个 PGRP 家族，分为短型(S)和长型(L)两种，短型的 PGRP 主要存在于昆虫的血淋巴、表皮和脂肪体中，有时存在中肠的上皮细胞和血细胞中；而长型的 PGRP 则主要存在于血细胞中(Kurata, 2004, 2014)。其中有些 PGRPs 是组成性表达，也有一些 PGRPs 是诱导性表达，在细菌感染或注射肽聚糖(peptidoglycan, PGN)时可上调其表达(Blanco *et al*., 2008)。PxPGRP-SA 是本实验室克隆获得的短型肽聚糖识别蛋白，本实验中分别用苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*，玫烟色棒束孢 *P. fumosoroseus*，绿僵菌 *M. anisopliae* 和大肠杆菌 *E. coli* DH5α 注射诱导小菜蛾后，qRT-PCR 检测结果表明，所有菌都能诱导 *PxPGRP-SA* 在脂肪体中的表达，相比较而言，*B. thuringiensis* 诱导 *PxPGRP-SA* 的表达要显著高于真菌和细菌的诱导效果，推测小菜蛾免疫 *B. thuringiensis* 侵染的强度要大于其他病菌，PxPGRP-SA 蛋白起着主要免疫调控作用。qRT-PCR 结果显示，注射具活性的 *B. thuringiensis* 可以诱导 *PxPGRP-SA* 在不同组织中高表达，表明 *PxPGRP-SA* 的表达是诱导型的，且在小菜蛾系统免疫 *B. thuringiensis* 的过程中起着主导作用。相比较而言，*PxPGRP-SA* 的表达量在血细胞中达到高峰的

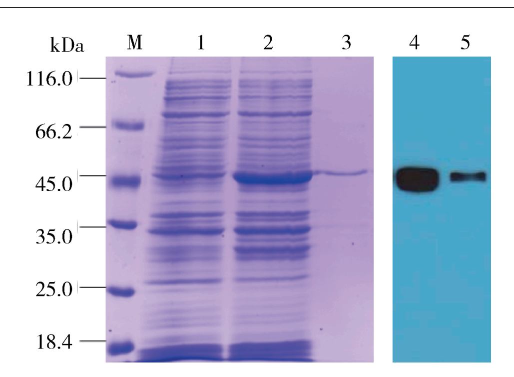


图 3　利用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测融合蛋白 PxPGRP-SA 的表达

Fig. 3　SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant PxPGRP-SA

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：pET-32a-PxPGRP-SA 未诱导 Bacterial lysate containing recombinant expression vector pET32-PxPGRP-SA without IPTG induction；2：融合蛋白 PxPGRP-SA 诱导 6 h 的表达 Bacterial lysate containing recombinant expression vector pET32-PxPGRP-SA after IPTG induction for 6 h；3：纯化后的融合蛋白 Purified recombinant PxPGRP-SA protein；4：纯化后融合蛋白 PxPGRP-SA 的 Western blot 检测 Western blot analysis of the purified protein；5：融合蛋白 PxPGRP-SA 诱导 6 h 的 Western blot 检测 Western blot analysis of the induced fusion protein.

时间要快于在脂肪体中，表明在血腔中，细胞免疫要早于体液免疫，推测 PxPGRP-SA 蛋白在细胞免疫中发挥了重要作用。小菜蛾中肠是第一道抵御自然界中 *B. thuringiensis* 侵染的防线，本实验中添食 *B. thuringiensis* 诱导 *PxPGRP-SA* 在中肠中的表达要显著高于注射 *B. thuringiensis* 诱导，推测 *PxPGRP-SA* 在小菜蛾中肠免疫防御 *B. thuringiensis* 侵染中起着重要作用。

外源性的 dsRNA 能有效、特异性地抑制昆虫内源基因的表达，诱导相关干扰表型的产生（Lu *et al.*, 2015）。根据赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 等个体较小的昆虫中相关 RNAi 研究报道，RNAi 效果在不同的昆虫中受 dsRNA 的注射时间及 dsRNA 的浓度的影响（Arakane *et al.*, 2005；Kato *et al.*, 2006）。在本研究中，选取的注射浓度为 1 μg/μL，注射量为1 μL。为了降低注射导致的物理损伤，我们选取小菜蛾高龄幼虫（4 龄）进行 dsRNA 注射。昆虫中的 RNAi 干扰研究表明，注入 dsRNA 后 24 h 可以检测

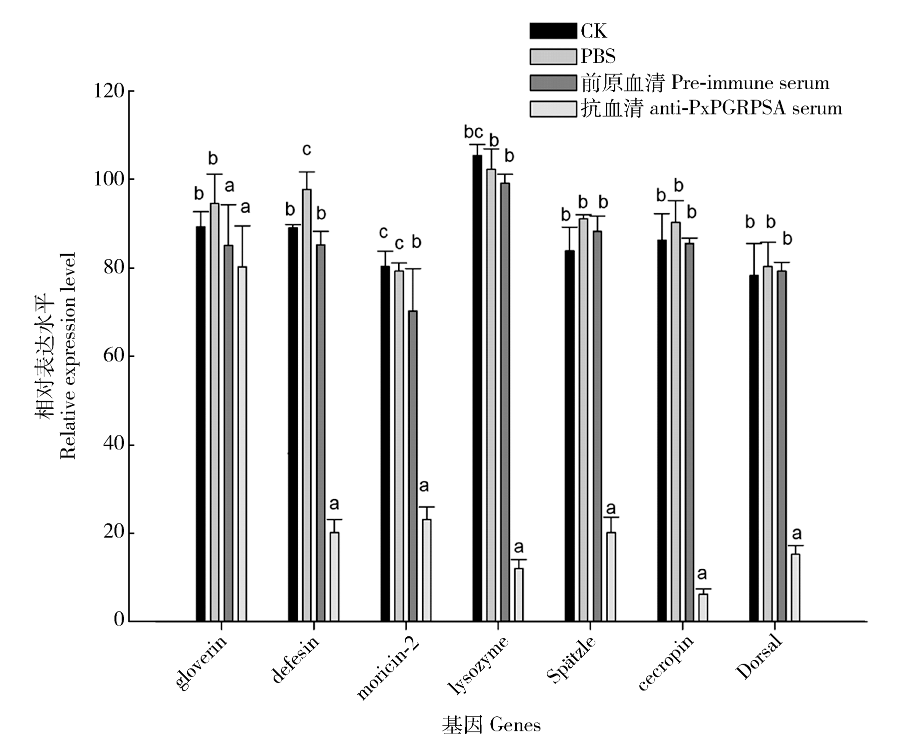


图 4　抗体封闭 PxPGRP-SA 后小菜蛾 4 龄幼虫脂肪体中免疫相关基因的 qRT-PCR 检测

Fig. 4　qRT-PCR analysis of the immunity related genes after blocking the activity of PxPGRP-SA by injection of anti-PxPGRP-SA serum in the fat body of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella*

qRT-PCR 分析注射 anti-PxPGRP-SA 后抗菌肽基因（*defensin*, *cecropin*, *moricin-2*, *gloverin*, *lysozyme*），*Spätzle* 和 *Dorsal* 的表达情况，PBS 和前原血清作为注射阴性对照，健康虫体作为空白对照（CK），利用邓肯氏方法进行多重比较，误差线代表 ±*SE*（n=3），*β-actin* 作为内参基因，不同字母表示同一基因不同处理间差异显著水平（$P<0.05$））。The qRT-PCR analysis of AMP genes (*defensin*, *cecropin*, *moricin-2*, *gloverin* and *lysozyme*), *Spätzle* and *Dorsal* in *P. xylostella* after injection of anti-PxPGRP-SA serum. Larvae injected with PBS and pre-immune serum were used as the injection controls and naïve larvae were used as the blank controls. *β-actin* was used as an internal control. Each bar represents the mean ± *SE* (n = 3). Means with different letters are significantly different among different treatments of the same gene ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test).

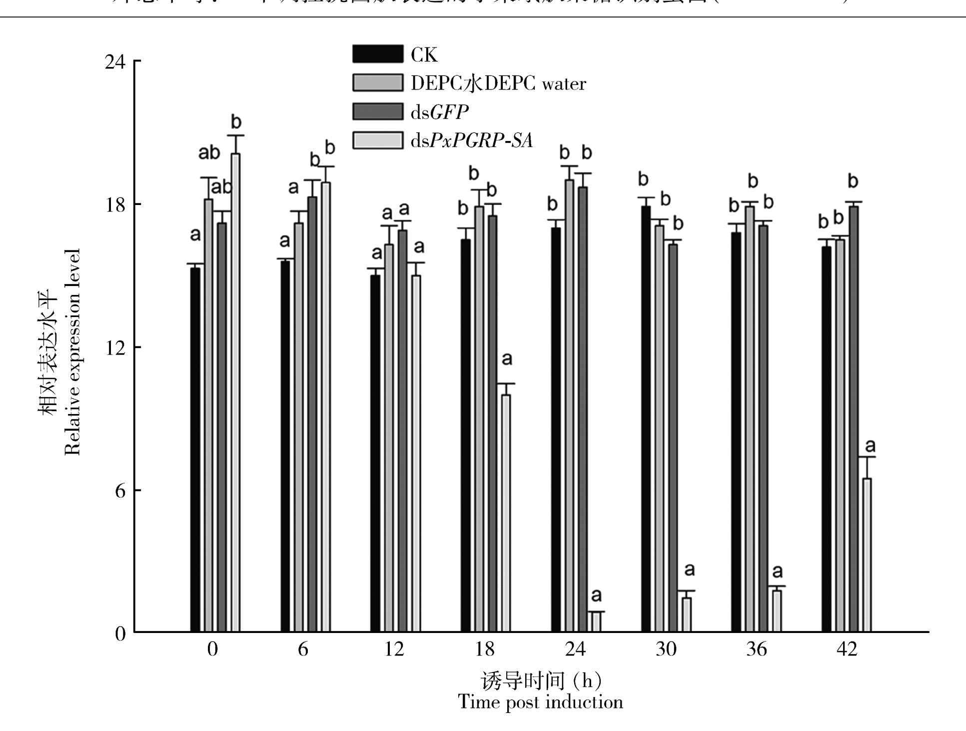


图 5　qRT-PCR 检测小菜蛾 4 龄幼虫脂肪体中 *PxPGRP-SA* 的 RNAi 效果

Fig. 5　RNAi effect of *PxPGRP-SA* in the fat body of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella* detected by qRT-PCR

qRT-PCR 分析 RNA 干扰 24 h 后，*Bacillus thuringiensis* 诱导后 *PxPGRP-SA* 的表达情况，DPEC 水作为注射对照，GFP 作为无干扰 RNA 注射，健康虫体作为空白对照(CK)，*β-actin* 作为内参基因，利用 Duncan 氏新复极差法进行多重比较，误差线代表 ± *SE*($n=3$)，不同字母表示同一诱导时间不同处理间差异显著水平($P<0.05$)。The qRT-PCR of *PxPGRP-SA* in *P. xylostella* after RNAi for 24 h followed by *Bacillus thuringiensis* induction. Larvae injected with DPEC water were used as the injection controls, GFP was use as no interference RNA injection and naïve larvae were used as the blank control (CK). *β-actin* was used as an internal control. Each bar represents the mean ± *SE* ($n=3$). Means with different letters are significantly different among different treatments of the same induction time ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test,).

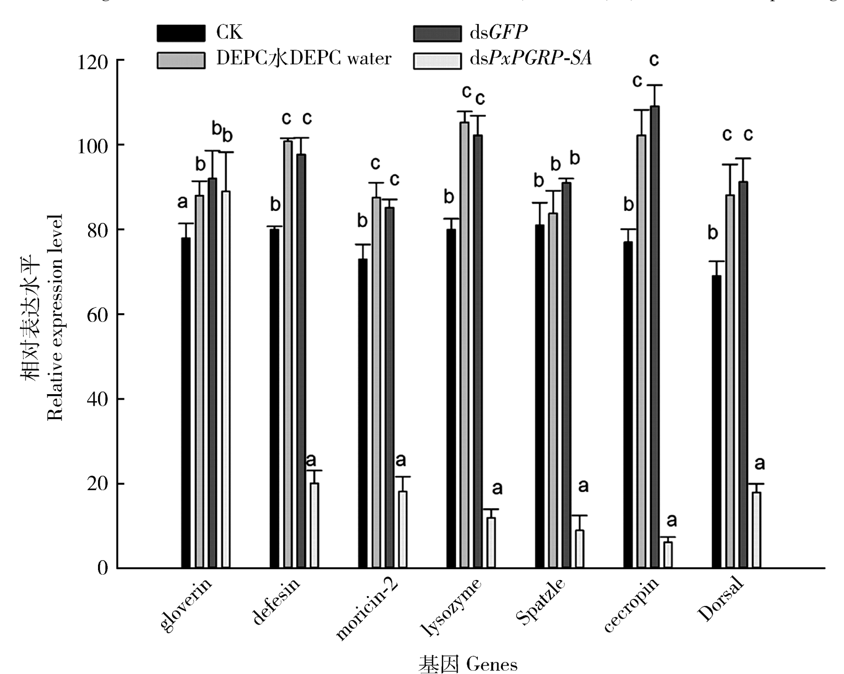


图 6　PGRP-SA RNAi 后小菜蛾 4 龄幼虫脂肪体中相关免疫基因的 qRT-PCR 检测

Fig. 6　qRT-PCR analysis of some immunity-related genes in the fat body of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella* after *PxPGRP-SA* RNAi

qRT-PCR 分析 RNA 干扰后小菜蛾体内抗菌肽基因(*defensin*，*cecropin*，*moricin*-2，*gloverin* 和 *lysozyme*)，*Spätzle* 和 *Dorsal* 表达情况，PBS 作为注射对照，GFP 作为无干扰 RNA 注射，健康虫体作为空白对照(CK)，*β-actin* 作为内参基因，利用 Duncan 氏新复极差法进行多重比较，误差线代表 ± *SE*($n=3$)，不同字母表示同一基因不同处理间差异显著水平($P<0.05$)。The qRT-PCR analysis of AMP genes (*defensin*, *cecropin*, *moricin*-2, *gloverin* and *lysozyme*), *Spätzle and Dorsal* in *P. xylostella* after RNAi. Larvae injected with DPEC water were used as the injection controls, GFP was use as no interference RNA injection and naïve larvae were used as the blank controls (CK). *β-actin* was used as an internal control. Each bar represents the mean ± *SE* ($n=3$). Means with different letters are significantly different among different treatments of the same gene ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test).

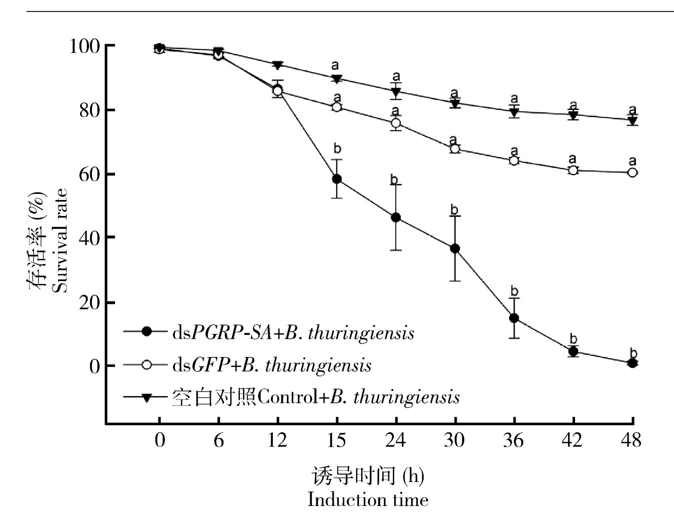


图7 经苏云金芽孢杆菌处理后小菜蛾4 龄幼虫的存活率
Fig. 7 Survival rate of the 4th instar larvae of *Plutella xylostella* after challenge with *Bacillus thuringiensis*
小菜蛾 *PxPGRP-SA* RNA 干扰之后，添食活的 *B. thuringiensis* 在0－48 h 内统计小菜蛾的存活率，实验重复3 次，处理80 头幼虫，利用邓肯氏方法进行多重比较，误差线代表 ± *SE*($n = 3$)，不同字母表明同一诱导时间不同处理间达到差异显著水平($P < 0.05$)。The susceptibility of *P. xylostella* larvae to *B. thuringiensis* (2.0×10^7 CFU/mL) was analyzed after silence of *PxPGRP-SA*. The survival rate was recorded from 0 to 48 h. Each treatment was replicated three times and each treatment consisted of 80 larvae. Each bar represents the mean ± *SE* ($n = 3$). Means with different letters are significantly different among different treatments of the same induction time ($P < 0.05$) (Duncan's multiple range test).

到靶标基因的干扰效果(Paskewitz *et al*., 2006),由于抗菌肽基因是诱导型表达,本实验在注射 dsRNA 24 h 后,再次注入苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 诱导抗菌肽基因的表达。在研究结果表明,RNAi 24 h 后,*PxPGRP-SA* 的转录水平大大降低,而且导致小菜蛾 *Spätzle* 和 *Dorsal* 基因的转录下调,并导致小菜蛾体内抗菌肽基因 *defensin*, *cecropin*, *moricin*-2 和 *lysozyme* 基因表达水平明显降低。在 *PxPGRP-SA* 基因转录沉默后,*B. thuringiensis* 侵染对小菜蛾的致死率显著升高。本实验结果表明,*PxPGRP-SA* 经 *B. thuringiensis* 侵染能够激活 Toll 信号通路,并能调控下游抗菌肽基因的表达,来抑制 *B. thuringiensis* 侵染。在果蝇以及家蚕 *Bombyx mori* 中,革兰氏阳性细菌主要诱导 Toll 途径调控抗菌肽的表达(Chen *et al*., 2014; Kurata, 2014)。在果蝇中,Toll 途径激活后也会促进 Imd 途径中下游转录因子的表达,同时 Imd 途径,也可以通过调控 PGRP 的表达从而影响 Toll 途径的免疫功(Kurata, 2014; Valanne, 2014)。在小菜蛾中 *B. thuringiensis* 的侵染在激活 Toll 途径的过程中,是否也同时激活 Imd 途径,调控抗菌肽的表达? 此问题仍需要进一步的实验证明。

注射小菜蛾 β-1,3-葡聚糖识别蛋白特异性抗血清到家蚕 *B. mori*,可以封闭家蚕 β-1,3-葡聚糖识别蛋白的活性,并降低了下游抗菌肽的表达,从而导致家蚕血淋巴中细菌的升高(Huang *et al*., 2015)。注射烟草天蛾 *Manduca sexta* Toll 样受体的抗血清到血腔,降低了 Toll 通路的信号传导,从而降低了下游抗菌肽的表达(Zhong *et al*., 2012)。本研究为了进一步验证 PxPGRP-SA 在 *B. thuringiensis* 侵染后对抗菌肽的表达调控,注射 PxPGRP-SA 抗血清到小菜蛾4 龄幼虫血腔,qRT-PCR 结果表明,PxPGRP-SA 蛋白的封闭降低了下游抗菌肽基因的表达。结果进一步证明,在 *B. thuringiensis* 侵染小菜蛾系统免疫的过程中,PxPGRP-SA 起着调控抗菌肽的作用。

随着人们对昆虫免疫系统认识的逐步加深,免疫信号通路也陆续被鉴定出来。家蚕以及果绳等模式生物的免疫防御机制都已经比较清楚,但是小菜蛾免疫系统对外界微生物侵染的响应机制还不清楚。小菜蛾基因组的破译(You *et al*., 2013),为寻找免疫防御基因提供了分子平台。在小菜蛾基因组里共发现9 个 PGRP 家族成员(Xia *et al*., 2015),它们免疫识别、防御 *B. thuringiensis* 侵染的功能更有待于进一步研究。弄清楚小菜蛾免疫防御 *B. thuringiensis* 侵染的机理将为更好地利用苏云金芽孢杆菌防治小菜蛾等害虫提供分子手段。

参考文献 (References)

Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ, 2005. *Laccase* 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(32): 11337－11342.

Beck M, Strand MR, 2005. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect High Five and S2 cells. *J. Virol*., 79(3): 1861－1870.

Blanco GA, Malchiodi EL, De Marzi MC, 2008. Cellular clot formation in a sipunculan worm: entrapment of foreign particles, cell death and identification of a PGRP-related protein. *J. Invertebr. Pathol*., 99(2): 156－165.

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*., 29(6): 263－271.

Chen K, Liu C, He Y, Jiang H, Lu Z, 2014. A short-type peptidoglycan recognition protein from the silkworm: expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway. *Dev. Comp. Immunol*., 45(1): 1－9.

Dziarski R, 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol. Immunol*., 40(12): 877－886.

Dziarski R, Gupta D, 2006. Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cell Microbiol*., 8(7): 1059－1069.

Elleuch J, Jacca S, Darriet F, Chandre F, Tounsi S, Zghal RZ, 2015.

Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. *Toxicon*, 104: 83 - 90.

Gendrin M, Zaidman-Rémy A, Broderick NA, Paredes J, Poidevin M, Roussel A, Lemaitre B, 2013. Functional analysis of PGRP-LA in *Drosophila* immunity. *PLoS ONE*, 8(7): e69742.

Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J, 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881): 640 - 644.

Green MR, Sambrook J, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2028 pp.

Guo ZJ, Kang S, Chen DF, Wu QJ, Wang SL, Xie W, Zhu X, Baxter SW, Zhou XG, Jurat-Fuentes JL, Zhang YJ, 2015. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. *PLoS Genet*., 11(4): e1005124.

Huang W, Xu X, Freed S, Zheng Z, Wang S, Ren S, Jin F, 2015. Molecular cloning and characterization of a β-1,3-glucan recognition proteins from *Plutella xylostella* (L.). *New Biotechnol*., 32(2): 290 - 299.

Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim JH, Ueda K, Oshima Y, Peach C, Erturk-Hasdemir D, Goldman WE, Oh BH, Kurata S, Silverman N, 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol*., 7(7): 715 - 723.

Kang DW, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H, 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(17): 10078 - 10082.

Kato T, Shimano H, Yamamoto T, Yokoo T, Endo Y, Ishikawa M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Kumadaki S, Yahagi N, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Hasty AH, Takahashi S, Gomi H, Izumi T, Yamada N, 2006. Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice. *Cell Metab*., 4(2): 143 - 154.

Kurata S, 2004. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol*., 28(2): 89 - 95.

Kurata S, 2014. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev. Comp. Immunol*., 42(1): 36 - 41.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol*., 25: 697 - 743.

Li YP, Xiao M, Li L, Song CX, Wang JL, Liu XS, 2015. Molecular characterization of a peptidoglycan recognition protein from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and its role in the prophenoloxidase activation pathway. *Mol. Immunol*., 65(1): 123 - 132.

Lu Q, Huang LY, Chen P, Yu JF, Xu J, Deng JY, Ye H, 2015. Identification and RNA interference of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) in the common cutworm moth *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol*., 108(3): 1344 - 1353.

Ni D, Song LS, Wu LT, Chang YQ, Yu YD, Qiu LM, Wang LL, 2007. Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Dev. Comp. Immunol*., 31(6): 548 - 558.

Ochiai M, Ashida M, 1999. A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem*., 274(17): 11854 - 11858.

Paskewitz SM, Andreev O, Shi L, 2006. Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 36(9): 701 - 711.

Royet J, 2004. *Drosophila melanogaster* innate immunity: an emerging role for peptidoglycan recognition proteins in bacteria detection. *Cell Mol. Life Sci*., 61(5): 537 - 546.

Steiner H, 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol. Rev*., 198(1): 83 - 96.

Tabashnik BE, Finson N, Groeters FR, Moar WJ, Johnson MW, Luo K, Adang MJ, 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(10): 4120 - 4124.

Valanne S, 2014. Functional genomic analysis of the *Drosophila* immune response. *Dev. Comp. Immunol*., 42(1): 93 - 101.

Werner T, Liu G, Kang DW, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25): 13772 - 13777.

Xia XF, Yu LY, Xue MQ, Yu XQ, Vasseur L, Gurr GM, Baxter SW, Lin HL, Lin JH, You MS, 2015. Genome-wide characterization and expression profiling of immune genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Sci. Rep*., 5: 09877.

Yang FS, Wu QJ, Xu BY, Cao LB, Zhu GR, Zhang YJ, 2006. Resistance selection of *Plutella xylostella* by Cry1Ac toxin and Bt formulation and biological fitness of the resistant populations. *Acta Entomologica Sinica*, 49(1): 64 - 69. [杨峰山, 吴青君, 徐宝云, 曹丽波, 朱国仁, 张友军, 2006. 小菜蛾对 Bt 毒素 Cry1Ac 和 Bt 制剂抗性的选育及其抗性种群的生物学适应性. 昆虫学报, 49(1): 64 - 69]

You MS, Yue Z, He WY, Yang XH, Yang G, Xie M, Zhan DL, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai JL, Wang P, Cui K, Huang SG, Li XC, Zhou Q, Wu ZY, Chen QL, Liu CH, Wang B, Li XJ, Xu XF, Lu CX, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen MS, Xia XF, Tang WQ, Ke FS, Zheng DD, Hu YL, Song FQ, You YC, Ma XL, Peng L, Zheng YK, Liang Y, Chen YQ, Yu LY, Zhang YN, Liu YY, Li GQ, Fang L, Li JX, Zhou X, Luo YD, Gou CY, Wang J, Wang J, Yang HM, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet*., 45(2): 220 - 225.

Yu ZL, Li JH, Xue NN, Nie P, Chang MX, 2014. Expression and functional characterization of PGRP6 splice variants in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Dev. Comp. Immunol*., 47(2): 264 - 274.

Zhong X, Xu XX, Yi HY, Lin C, Yu XQ, 2012. A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 42(7): 514 - 524.

(责任编辑: 袁德成)